



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/achaem](http://www.elsevier.com/locate/achaem)

Praca poglądowa/Review

## Mutacje TP53 w nowotworach hematologicznych

### TP53 mutations in hematologic malignancies

Małgorzata Zajac<sup>1,\*</sup>, Krzysztof Giannopoulos<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Lublin, Polska<sup>2</sup> Oddział Hematologiczny, Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej, Lublin, Polska

## INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 07.10.2015

Zaakceptowano: 09.11.2015

Dostępne online: 19.11.2015

Słowa kluczowe:

- gen TP53
- supresor nowotworowy p53
- proliferacja komórek

Keywords:

- TP53 gene
- Tumor suppressor p53
- Cell proliferation

## A B S T R A C T

The tumor suppressor p53 plays a crucial role in regulation of cell proliferation and maintaining integrity of the genome in human tissue. TP53 mutations are found in about 50% of solid tumors; however, hematological malignancies present a lower incidence of alteration in this gene. Within this group of patients, mutations of TP53 and 17p deletion are associated with poor prognosis and resistance to standard chemotherapy. During the past few years, treatment of patients with TP53 aberrations has become a major challenge of modern hematology. Currently, there are ongoing clinical trials on drugs that can affect directly p53 activity or cause activation of other mechanisms, which could convert bad prognosis of patients with TP53 aberrations. Since TP53 mutations carry prognostic significance in CLL and are relevant in choosing the treatment for CLL patients, ERIC (European Research Initiative for CLL) made an attempt to standardize assessment of TP53 mutations.

© 2015 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

## Wprowadzenie

Gen TP53 znajduje się w chromosomie 17 (17p13.1) i składa się z 11 eksonów oraz 10 intronów [1]. Produktem translacji genu jest fosfoproteina o masie cząsteczkowej 53 kDa, która pełni funkcje głównego supresora nowotworowego występującego w komórkach organizmu ludzkiego. Białko to jest czynnikiem transkrypcyjnym zbudowanym z charakterystycznych dla aktywatorów transkrypcji domen: N-końcowej, domeny odpowiedzialnej za wiązanie się z DNA oraz domeny C-końcowej, spełniających określone funkcje [2]. Białko p53

ma liczne izoformy powstające drogą alternatywnego składowania transkryptów. Obecnie rozróżniono co najmniej 12 izoform, których odrębność funkcjonalna jest wciąż tematem wielu badań [3].

P53 odgrywa kluczową rolę w regulacji proliferacji komórek, głównie poprzez indukowanie końca cyklu komórkowego, apoptozy lub aktywowanie systemów naprawczych DNA [4]. Uszkodzenie DNA inicjuje nadekspresję p53, indukując zahamowanie fazy cyklu komórkowego G1, przez co p53 utrzymuje integralność genomu. W przypadku rozległych uszkodzeń, podczas których DNA nie podlega naprawie, p53 transaktywuje geny odpowiedzialne za apoptozę [5–7]. Mutacja TP53

\* Adres do korespondencji: Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Polska. Tel.: +48 81 448 66 30; fax: +48 81 448 66 34.

Adres email: [kicaaj@gmail.com](mailto:kicaaj@gmail.com) (M. Zajac).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2015.11.005>

0001-5814/© 2015 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

uniemożliwia hamowanie fazy G1 oraz powoduje deregulację apoptozy, skutkując transformacją nowotworową i proliferacją uszkodzonych komórek [5, 6, 8, 9]. Utrata funkcji p53 jest kluczowym zdarzeniem w procesie nowotworzenia i związana jest z wieloma procesami charakterystycznymi dla nowotworów, takimi jak: deregulacja cyklu komórkowego, niestabilność genomu czy oporność na chemioterapię [10, 11].

Całkowita utrata funkcji p53 może być spowodowana współistniejącą mutacją TP53 oraz delecją pozostałego allelu 17p, mutacją obu alleli lub homozygotyczną mutacją powstałą na skutek utraty heterozygotyczności (*loss of heterozygosity*; LOH). Innym mechanizmem ograniczającym funkcje p53 jest dominujący negatywny efekt zmutowanego białka, formującego kompleksy z jego niezmienną postacią. Obecność tych kompleksów uniemożliwia wiązanie się prawidłowego białka p53 do DNA i hamuje transaktywację innych genów. Dodatkowo, sugeruje się, że mutacje TP53 mogą również powodować zmianę termowrażliwości białka oraz skutkować nabywaniem nowych właściwości (*gain of function*; GOF), powodujących progresję nowotworu czy zwiększanie oporności na leczenie [12].

Utrata funkcji p53 spowodowana delecjami lub mutacjami stwierdzana jest w około 50% typów guzów litych [13], jednak występowanie mutacji w genie TP53 jest znacznie rzadsze w przypadku nowotworów hematologicznych [14–16].

Mutacje TP53 cechuje heterogenność zarówno pod względem struktury, jak i lokalizacji. Najczęstszymi zmianami są mutacje zmiany sensu prowadzące do zmiany aminokwasów, które stanowią około 75% wszystkich mutacji. Są one umiejscowione w obrębie eksonów 3–10, jednak stanowczą większość identyfikowana jest w eksonach 5–8 w kodonach 175 (ekson 5), 248 (ekson 7) oraz 273 (ekson 8), stanowiących tzw. *hot-spots*. Rzadziej spotykane są mutacje nonsensowne, delecje, insercje czy mutacje w miejscach składania transkryptów [17–19].

---

## AML

W grupie chorych na ostrą białaczkę szpikową *de novo* (*acute myeloid leukemia*; AML) mutacje TP53 znajdowane są na poziomie 3–8% [14, 19–21]. Najczęstszą mutacją jest pojedyncza substytucja nukleotydu G na C, jednak w porównaniu z AML związanych z leczeniem czy innych nowotworów hematologicznych i guzów litych spektrum mutacji w przypadkach AML *de novo* nie przedstawia swoistych cech [22, 23]. Mutacje TP53 są zazwyczaj powiązane z delecją 17p, głównie w następstwie niezbalansowanej translokacji, jak na przykład t(5;17), co skutkuje inaktywacją obu alleli TP53 [19]. Ich występowanie w tej grupie chorych obserwowane było w prawie 90% przypadków [17, 24]. W przeciwieństwie do chorych bez delecji 17p, mutacja TP53 występowała u 66–84% pacjentów [17, 24], co sugeruje, że zjawiska współwystępowania delecji i mutacji punktowych obu homologicznych alleli są częste, ale nie bezwzględnie powiązane [17, 25]. Zwiększony poziom mutacji został również powiązany z występowaniem nieprawidłowej naprawy błędnie sparowanych nukleotydów [26]. Mutacje w genie TP53 zostały zidentyfikowane na poziomie 60–70% u chorych ze złożonym kariotypem, co wykazuje ich ścisłą zależność z tą grupą cytogenetyczną [17, 21].

Istotnie częściej występują one u chorych w zaawansowanym wieku, powiązane są ze swoistymi zmianami liczby kopii DNA, kariotypem monosomalnym oraz niekorzystnym rokowaniem [18]. Dodatkowo, ostatnie wyniki badań przeprowadzone przez Hou i wsp. [21] wykazały korelację mutacji TP53 z niższą liczbą leukocytów i podtypem M6 według klasyfikacji FAB oraz wzajemne wykluczanie się z mutacjami w genach nukleofosminy-1 (*nucleophosmin-1*; NPM1), metylotransferazy 3A DNA (*DNA methyltransferase 3a*; DNMT3A) oraz z wewnętrzną tandemową duplikacją kinazy tyrozynowej FLT3 (*FLT3-internal tandem duplication*; FLT3-ITD).

Chorzy z mutacją TP53 są zazwyczaj oporni na chemioterapię i charakteryzują się bardzo krótkim przeżyciem [27]. Częstość mutacji TP53 wzrasta w grupach chorych na AML i zespoły mielodysplastyczne (*myelodysplastic syndrome*; MDS) zależne od leczenia (*therapy related AML*; t-AML, *therapy related MDS*; t-MDS), odsetek mutacji wynosi odpowiednio 18% i 28% i może być następstwem leczenia lekami alkilującymi, pochodnymi platyny czy inhibitorami topoizomerazy II [28–30]. Dodatkowo wykazano, że w przypadku chorych na AML *de novo* przeważają mutacje TP53 w postaci substytucji nukleotydów G na C, natomiast w przypadku chorych na t-AML częściej obserwowane są substytucje nukleotydów A na T [29].

---

## MDS

W grupie MDS mutacje TP53 identyfikowane są u około 8–9% chorych [31, 32] i, podobnie jak w przypadku AML, częstość mutacji zwiększa się u chorych leczonych wcześniej lekami alkilującymi [29]. Kulasekararaj i wsp. [32] wykazali silną zależność między mutacjami TP53 a aberracjami chromosomu 5, identyfikując je u 19% chorych z izolowaną delecją 5q oraz u 72% chorych ze złożonym kariotypem, w tym zmianą -5/5q. Dodatkowo mutacje TP53 korelowały z II pośrednim stadium zaawansowania choroby wg skali IPSS, ekspresją białka p53, większą liczbą komórek blastycznych oraz progresją choroby. Mutacje zmiany sensu pojawiały się znacznie częściej w dwóch typach MDS: RAEB (*Refractory Anemia with Excess Blasts*) oraz RAEB-T (*Refractory Anemia with Excess Blasts in Transformation*), którym częściej towarzyszył kariotyp złożony [28, 33]. Mutacje zmiany sensu wykrywane w eksonach 4–8 obserwowane były zarówno jako zdarzenia wczesne, jak i późne, wiązały się z gwałtownym przebiegiem choroby i niekorzystnym rokowaniem [29].

---

## ALL

U chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną (*acute lymphoblastic leukemia*; ALL) mutacje TP53 występują na poziomie 2–3%, jednak, biorąc pod uwagę zmiany, takie jak hipermetylacje miejsca promotorowego, nieprawidłowości genu TP53 mogą występować znacznie częściej tj. u 30–40% chorych [15]. Wykrywane są one głównie u dzieci, gdzie najczęściej pojawiają się w czasie nawrotów i są związane z gorszym rokowaniem [34, 35]. Istnieje tylko kilka doniesień o stanie mutacji TP53 u dorosłych chorych, jednak obejmują one niewielkie grupy oraz głównie pacjentów z nawrotami choroby [36, 37].

Analiza stanu mutacji TP53 u dorosłych chorych na ALL przeprowadzona przez zespół Chiaretti [38] obejmowała grupę 98 pacjentów i wykazała mutacje u 8,2% chorych, co było porównywalne z poziomem mutacji wykrywanych u chorych na AML w czasie diagnozy oraz u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (*chronic lymphocytic leukemia*; CLL) w czasie progresji [39, 40]. Wyniki te potwierdziły poprzednie doniesienia, w których mutacje TP53 były częściej znajdowane w nawrotowej postaci choroby [35–37]. Mutacje TP53 wykrywane były częściej w ALL wywodzącej się z linii limfocytów T niż w ALL wywodzącej się z linii limfocytów B, gdzie stanowiły 14% przypadków negatywnych pod względem występowania nawracających genów fuzyjnych [38]. Ostatnio, Stengel i wsp. [41] przebadali grupę 625 chorych na ALL, gdzie mutacje TP53 stanowiły 15,7%, a ich odsetek wzrastał z wiekiem. Mutacje znajdowane były najczęściej w grupach ALL z niskim poziomem hipodiploidii (32–39 chromosomów) i rearanżacjami genu MYC. Mutacje obu alleli TP53 obserwowane były u 12% chorych, natomiast mutacja i współtowarzysząca delecja drugiego allelu wykrywana była u 39% chorych. Wysoki odsetek mutacji korelował z niskim poziomem hipodiploidii, wysokim poziomem hiperdiploidii, kariotypem złożonym oraz obserwowany był częściej u chorych ALL wywodzących się z linii limfocytów B. Podobnie jak w przypadku innych nowotworów, mutacje TP53 związane były z krótszym przeżyciem, szczególnie w przypadkach, kiedy oba allele genu były dotknięte zmianą [41].

---

## MM

Mutacje TP53 występują rzadko u chorych na szpiczaka plazmocytozy (multiple myeloma; MM), są wykrywane u 3% nowozdiagnozowanych pacjentów, jednak ich odsetek wzrasta w bardziej zaawansowanych stadiach choroby [42]. Chng i wsp. [42] wykazali, że obecność mutacji TP53 była istotnie związana z występowaniem delecji 17p13, co stanowiło 56% przypadków, i po raz pierwszy została opisana jako czynnik o niezwykle niekorzystnym rokowaniu związany jedynie z 1,5-letnim przeżyciem chorych. W przeciwieństwie do tych wyników Lode i wsp. [43] donieśli, że mutacje TP53 są ściśle związane z delecją 17p, jednak analiza przeżycia nie wykazała żadnych różnic wśród chorych z delecją 17p między grupami z lub bez współistniejącej mutacji TP53. Dotychczasowe badania wykonywane były na nielicznych grupach chorych, dlatego jednoznaczne określenie zależności oraz znaczenia mutacji TP53 u tych pacjentów wymaga dalszych weryfikacji. Utrata funkcji tego genu stwierdzana jest w znacznie większej liczbie przypadków, dodatkowo wg Lode i wsp. [43], większość delecji 17p (około 63%) jest hemizygotyczna, co sugeruje, że u chorych bez mutacji TP53 zachowane jest funkcjonalne białko i potencjalnie może ono przezwyciężyć negatywny efekt delecji 17p, jednak bez określonego znaczenia klinicznego.

---

## CLL

Nieprawidłowości genu TP53 wykrywane są na poziomie 10–15% u nieleczonych chorych na CLL, jednak ich częstość

wzrasta do 40–50% u chorych opornych na leczenie fludarabiną [44, 45]. U ponad 80% przypadków z delecją 17p zaobserwowano występowanie mutacji TP53 w pozostałym allelu [46–48]. Ostatnie wyniki badań wykazały, że mutacje TP53 bez współistniejącej delecji 17p występują u około 5% chorych w pierwszej linii leczenia i są związane ze znacznie gorszym przeżyciem, zwłaszcza w przypadku mutacji znajdującej się w domenie wiążącej DNA [40, 47, 49]. Chorzy, u których wykryto mutacje w domenie wiążącej DNA, charakteryzowali się znacznie krótszym czasem wolnym od leczenia oraz czasem całkowitego przeżycia w porównaniu z chorymi mającymi mutacje zmiany sensu w innych miejscach białka oraz mutacje inne niż zmiany sensu [50]. Spektrum mutacji TP53 identyfikowane u chorych na CLL jest podobne do innych nowotworów jednak zaobserwowano kilka cech swoistych jedynie dla tej grupy pacjentów [49]. Badania oparte na wielośrodkowych analizach wykazały niższy odsetek tranzycji w miejscach CpG w porównaniu z innymi nowotworami. Zaobserwowano przeważającą liczbę tranzycji G na A w porównaniu z C na T, podczas gdy w przypadku innych nowotworów obserwowano podobne proporcje obu zmian [51].

Stan mutacji genów zmiennej części łańcucha immunoglobulin (*immunoglobulin heavy variable chain*; IGHV) jest niezależnym czynnikiem prognostycznym chorych na CLL. Pozwala on na rozróżnienie grupy z mutacją IGHV o korzystnym rokowaniu oraz grupy bez mutacji charakteryzującej się agresywnym przebiegiem choroby [52, 53], co wskazuje na istotną rolę receptora B-komórkowego (*B cell receptor*; BCR) w patogenezie CLL. Dodatkowo, w około 20% przypadków nieleczonych pacjentów stwierdza się występowanie niemal identycznych BCR, tzw. stereotypowych BCR. Wydaje się, że BCR odgrywa rolę w oddziaływaniu z komórkami podścieliska [54]. Do tej pory współwystępowanie stymulacji mikrośrodowiska wraz z nieprawidłowościami genów związanych z rozwojem nowotworu, w tym TP53, stanowiło niewyjaśnioną kwestię. Podjęto próbę zbadania, czy oba zdarzenia są ze sobą powiązane, czy też wykazują niezależne mechanizmy prowadzące do rozwoju CLL. Pierwsze analizy mutacji TP53 odnoszące się do stanu mutacji genów IGHV u chorych na CLL wykazały zwiększony odsetek w grupie z niezmutowanym IGHV. Dodatkowo, zaobserwowano różny profil mutacji TP53 w zależności od podtypu stereotypowych CLL [55]. W tabeli I przedstawiono częstość występowania mutacji TP53 w poszczególnych grupach chorych na nowotwory hematologiczne.

---

## Metody detekcji mutacji TP53

Aktualnie mutacje TP53 uznawane są za silny czynnik predykcyjny związany z gorszym przeżyciem oraz nawrotami u chorych na CLL [40, 46, 47, 56–58]. Wiele doniesień potwierdziło ich znaczenie kliniczne oraz bezpośrednio zastosowanie w postępowaniu terapeutycznym [49, 59–61]. Do tej pory stan mutacji TP53 nie był rutynowo oceniany, przez co również nie były dostępne wystandaryzowane testy i metody do jego określenia. Zważywszy na wartość rokowniczą oraz znaczenie w wyborze optymalnej metody leczenia, Europejska Grupa do Badań nad CLL (*European Research*

**Tabela I – Odsetek mutacji TP53 u chorych na nowotwory hematologiczne**  
**Table I – TP53 mutations in hematological malignancies**

Jednostka chorobowa	Odsetek chorych z mutacją TP53	Piśmiennictwo
AML	3–8%	[14, 19–21]
AML z delecją 17p	90%	[17, 24]
AML ze złożonym kariotypem	60–70%	[17, 21]
t-AML	18%	[28–30]
MDS	8–9%	[31, 32]
MDS z delecją 5q	19%	[32]
MDS ze złożonym kariotypem	72%	[32]
t-MDS	28%	[28–30]
ALL	15,7%	[41]
ALL z delecją 17p	39%	[41]
MM	3%	[42]
MM z delecją 17p13	37–56%	[42, 43]
CLL	10–15%	[44, 45]
CLL z delecją 17p	80%	[46–48]

Initiative on CLL; ERIC) podjęła próbę standaryzacji metody do oceny stanu mutacji [59].

Istnieje kilka metod umożliwiających wykrycie mutacji TP53. Należy mieć na uwadze, że wynik uzależniony jest od ilości komórek białaczkowych we krwi obwodowej. Jeśli ich odsetek nie przekracza 50%, należy rozważyć pobranie szpiku kostnego, zwłaszcza jeśli metodą oceny stanu mutacji jest bezpośrednie sekwencjonowanie metodą Sangera. Alternatywą mogą być również separowane komórki CD19+ [59].

Obecnie rekomendowaną metodą do oznaczania stanu mutacji genu TP53 jest bezpośrednie sekwencjonowanie metodą Sangera [59]. Niektóre mutacje mogą prowadzić do degradacji RNA zachodzącej na drodze rozpoznawania i niszczenia transkryptu zawierającego przedwczesny kodon stop [62], dlatego też materiałem z wyboru jest genomowe DNA. Z uwagi na usytuowanie mutacji wewnątrz genu TP53 rekomenduje się sekwencjonowanie eksonów 4–9. Nie stwierdzono mutacji w eksonach 2, 3 oraz 11, natomiast w eksonie 10 wykryto jedynie 4% wszystkich mutacji TP53 [49]. Bezpośrednie sekwencjonowanie wydaje się względnie prostą metodą, dostępną w większości laboratoriów, jednak jej czułość jest ograniczona w przypadkach występowania małych populacji komórek białaczkowych, gdzie zmiany molekularne mogą pozostać niewykryte. Pozytywny wynik sekwencjonowania dla mutacji TP53 powinien być potwierdzony oddzielną reakcją PCR. Niekorzystnym aspektem dotyczącym metody bezpośredniego sekwencjonowania jest względnie długi czas związany z przygotowaniem reakcji oraz niska czułość (jedynie 25% zmutowanych alleli w próbce).

Spśród innych dostępnych metod można wyróżnić metody przesiewowe, takie jak denaturująca wysokosprawną chromatografię cieczową czy badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA, charakteryzujące się większą czułością oraz niższym kosztem. Wyniki tych analiz muszą być jednak potwierdzone reakcją sekwencjonowania, w celu wykluczenia błędów wynikających z artefaktów. Mimo wielu zalet, takich jak szybkość, prostota, ekonomiczność oraz

wysoka czułość, wyniki uzyskane tymi metodami nie dostarczają informacji na temat rodzaju mutacji.

Kolejną techniką jest funkcjonalna analiza alleli w drożdżach (*Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast*; FASAY). Metoda ta oparta jest na klonowaniu komplementarnego DNA pochodzącego z komórki nowotworowej do zmodyfikowanych komórek drożdży. Ekspresja genu TP53 powoduje transkrypcję genu reportera ADE2, będącego enzymem uczestniczącym w syntezie adeniny. Niefunkcjonalne białko p53 nie wzbudza aktywacji reportera i prowadzi do akumulacji pośredniego czerwonego produktu metabolizmu adeniny. Kolejnym etapem jest sekwencjonowanie materiału pochodzącego z czerwonych kolonii drożdży. FASAY jest metodą tanią, wykazującą czułość już przy około 10% zawartości zmutowanego DNA obecnego w próbce. Metoda ta może być jednak niewystarczająca do wykrycia mutacji prowadzących do uszkodzenia RNA. Ponadto, wyniki uzyskane techniką FASAY powinny być zawsze potwierdzone reakcją sekwencjonowania.

Istnieją dwie platformy mikromacierzy stosowane do oznaczania mutacji TP53 (GeneChip Arrays oraz p53 AmpliChip) [63]. Działanie mikromacierzy GeneChip oparte jest na technice wydłużania starterów przymocowanych do mikromacierzy (*Arrayed Primer Extension*; APEX), pozwalającej na szybką i czułą identyfikację mutacji w genie TP53. APEX łączy technologię sekwencjonowania Sangera z jednoczesnym użyciem wysokoprzepustowego potencjału mikromacierzy. Badane DNA jest powielane, następnie podlega enzymatycznej fragmentacji i hybrydyzacji do immobilizowanych na płytce starterów. W kolejnym etapie zachodzi wydłużanie oligonukleotydów z użyciem czterech fluorescencyjnie znakowanych dideoksynukleotydów. Każda sekwencja jest kolejno wydłużana przez zastosowanie dwóch starterów skierowanych do nici sensownej i antysensownej [64]. Mikromacierze zostały zaprojektowane do wykrywania 95% znanych mutacji TP53 [64]. Platforma p53 AmpliChip została wykorzystana jako narzędzie diagnostyczne służące do detekcji wszystkich substytucji pojedynczych par zasad oraz delecji pojedynczych nukleotydów leżących w eksonach 2–11 i miejscach składania transkryptów z limitem detekcji około 1–2% zmutowanego DNA. Zaletami mikromacierzy AmpliChip są szybkość oraz łatwość użycia, natomiast platformy GeneChips Arrays jednoczesna analiza mutacji wielu genów. Obecnie mikromacierze tego typu nie są powszechnie dostępne [59]. Zastosowanie technologii wysokoprzepustowego sekwencjonowania (*next generation sequencing*; NGS) do oceny stanu mutacji TP53 wydaje się coraz bardziej dostępnym rozwiązaniem. Analizując dużą liczbę pacjentów lub wiele sekwencji, NGS prezentuje tańszą oraz mniej czasochłonną opcję w porównaniu z innymi metodami. W zależności od oczekiwanych wyników sekwenator może służyć do jednoczesnej analizy dużej liczby próbek lub dzięki tzw. głębokiemu sekwencjonowaniu może być zastosowany do sekwencjonowania próbek z bardzo dużą czułością. Główną trudnością związaną z techniką głębokiego sekwencjonowania jest interpretacja wyników polegająca na odróżnieniu faktycznych mutacji od przypadkowych błędów [65, 66]. Identyfikacja małych populacji uzależniona jest m.in od: 1) wystarczającej ilości materiału genetycznego poddanego analizie, 2) ilości odczytów dla próbki czy 3)

błędów występujących na każdym etapie przygotowania próbki, w procesie sekwencjonowania i analizy danych. Ostatnie wyniki badań przeprowadzone techniką głębokiego sekwencjonowania wykazały obecność małych subpopulacji komórek z mutacją TP53 u 9% nieleczonych chorych na CLL, które ze względu na bardzo niski poziom nie zostały wykryte metodą konwencjonalnego sekwencjonowania Sangera [67]. Chorzy, u których wykryto małe subpopulacje z mutacją TP53, charakteryzowali się podobnym fenotypem klinicznym oraz przeżyciem w porównaniu z chorymi z dominującym klonem komórek objętych mutacją. Dodatkowo kolejne analizy wykazały, że komórki z mutacją TP53 wykryte przed rozpoczęciem leczenia ulegały ekspansji i stanowiły główną populację komórek nowotworowych w czasie nawrotu, jak również przyczyniały się do rozwoju oporności na chemioterapię [67]. Dzięki dużej czułości metoda głębokiego sekwencjonowania NGS umożliwiła wykrycie bardzo małych populacji z mutacją TP53, które również mają znaczenie kliniczne u chorych na CLL. W związku z tym użycie NGS w przyszłych badaniach wydaje się zasadne i mogłoby służyć do szczegółowej analizy nieprawidłowości genu TP53 u tych chorych [67].

### **Leczenie chorych z nieprawidłowościami genu TP53 w nowotworach hematologicznych**

Leczenie chorych z nieprawidłowościami genu TP53 jest wyzwaniem współczesnej hematologii, ze względu na związane z tą aberracją złe rokowanie oraz oporność na tradycyjne schematy leczenia. Leczenie to może być nakierowane bezpośrednio na aktywność p53 lub aktywację innych mechanizmów i osiągają dobre odpowiedzi kliniczne w tej grupie chorych.

### **Leczenie nacelowane na nieprawidłowości szlaku p53 w nowotworach hematologicznych**

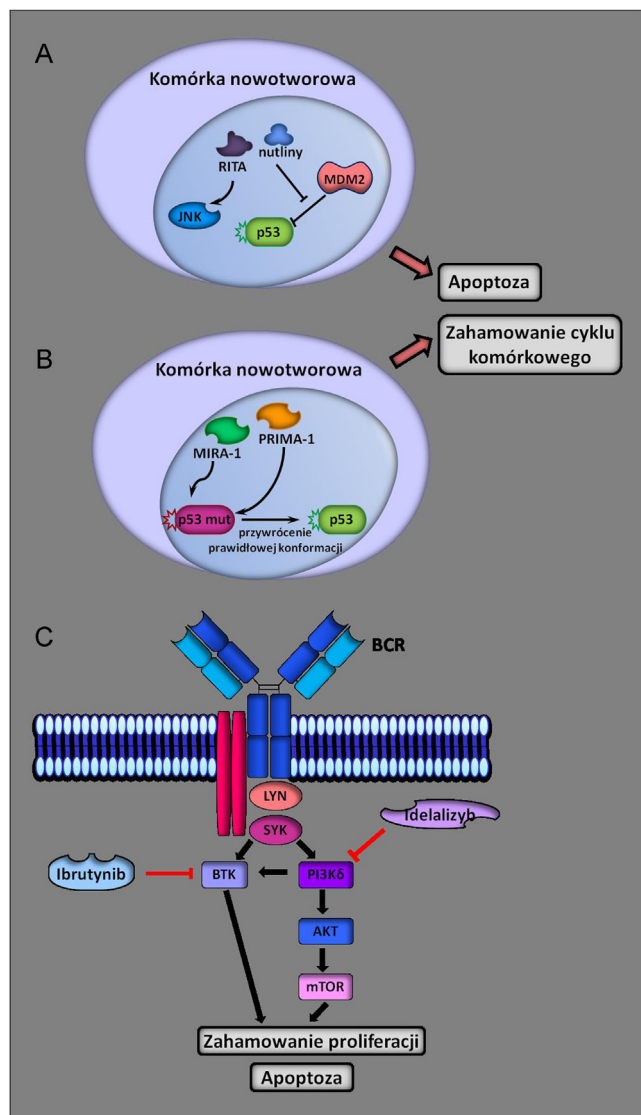
Istnieje wiele dowodów na to, że leki przeciwnowotworowe indukują apoptozę poprzez różne mechanizmy, które przynajmniej częściowo zależne są od aktywacji białka p53 [68–71]. Aktualnie podjęte są próby rozwoju strategii leczenia opartych na małych cząsteczkach, które w sposób swoisty mogłyby modulować aktywność tego białka. Wyróżnić można dwie kategorie cząsteczek: pierwsze z nich mają na celu modulowanie aktywności dzikiego typu białka p53, natomiast drugie odpowiedzialne są za przywrócenie prawidłowych funkcji zmutowanego białka. Zastosowanie badań komórkowych umożliwiło zidentyfikowanie małych cząsteczek, które z udziałem białka p53 mogą powodować niszczenie komórek nowotworowych [69–71]. Do cząsteczek tych należą nutliny, RITA (*reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis*) oraz PRIMA-1 (*p53 reactivation and induction of massive apoptosis*) [72–74]. Z drugiej strony wyniki analiz białkowych pozwoliły na zidentyfikowanie związków chemicznych, które bezpośrednio oddziałują z konkretnymi białkami, jednak mogą one odznaczać się znaczną toksycznością oraz niewystarczającą biodostępnością [74–76]. Małe cząsteczki należące do wyżej wymienionych kategorii są wciąż tematem badań, niektóre z nich zostały zakwalifikowane do

zaawansowanych prób przedklinicznych bądź do wczesnych faz (1/2) badań klinicznych.

Nutliny zostały opisane jako pierwsze cząsteczki hamujące oddziaływanie między białkiem p53, a jego negatywnym regulatorem – białkiem MDM2 [72]. Reprezentują one związki, które nie wykazują działania genotoksycznego, a ich aktywność oparta jest na wiązaniu się do kieszeni wiążącej p53 w białku MDM2, co powoduje uwolnienie p53 spod negatywnej kontroli MDM2. Efekt ten prowadzi do skutecznej stabilizacji p53 i jego aktywacji w komórkach nowotworowych wykazujących ekspresję dzikiego typu białka p53, lecz nie zmutowanego białka [72, 76, 77]. Od czasu ich wykrycia nutliny stały się jednymi z najbardziej badanych małych cząsteczek w kontekście terapii przeciwnowotworowej (NCT00623870, NCT00559533). W badaniach przedklinicznych wykazywały one wysoki potencjał leczniczy dla nowotworów hematologicznych [78–82]. Wykazano, że nutliny indukują odpowiedź cytotoksyczną oraz apoptozę w komórkach pochodzących od chorych na AML oraz ALL [78, 79, 83, 84]. Selektywna aktywacja p53 poprzez nutliny indukowała w sposób zmienny apoptozę komórek pochodzących od chorych na CML [85, 86] oraz CLL zarówno o niskim, jak i wysokim stopniu ryzyka choroby [87–90]. Aktywność przeciwnowotworowa nutlin została również zaobserwowana w komórkach pochodzących od chorych na MM oraz w komórkach mikrośrodowiska szpiku kostnego tych pacjentów [81, 91, 92].

Kolejną cząsteczką powodującą reaktywację p53 jest RITA. Wiążąc się z p53, RITA rozrywa jego wiązanie z MDM2, co powoduje indukcję apoptozy [73, 76]. Aktywność cząsteczki RITA została pierwszy raz opisana dla komórek pochodzących od chorych na CLL oraz AML [14]. W badaniu tym wykazano ciągłą aktywację szlaku przekazywania sygnału z udziałem białka p53, prowadzącą do indukcji końca cyklu komórkowego oraz apoptozy komórek AML i CLL z ekspresją dzikiego typu p53 [14]. Wykazano również jej działanie synergistyczne w połączeniu z fludarabiną w komórkach CLL bez względu na status p53 oraz w połączeniu z PRIMA-1 w komórkach AML [14]. Przeciwnowotworowa aktywność tej cząsteczki została wykazana również dla komórek MM [93]. Początkowo uważano, że RITA wiąże się z domeną N-końcową białka p53, indukując jego zmianę konformacyjną i powodując wzrost jego czasu półtrwania oraz akumulację w komórkach nowotworowych. Ostatnie badania wykorzystujące metodę spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (*nuclear magnetic resonance*; NMR) wykazały, że cząsteczka RITA może zmieniać funkcje p53 poprzez odrębne mechanizmy, takie jak oddziaływanie z innymi białkami wiążącymi czy kofaktorami [94]. Saha i wsp. [95] wykazali, że RITA może wiązać się z N-końcem kinazy c-Jun (*c-Jun N-terminal kinase*; JUN) i w ten sposób indukować apoptozę w komórkach MM. Na rycinie 1A przedstawiono mechanizmy działania nutlin oraz cząsteczki RITA na dziki typ białka p53, prowadzące do apoptozy komórek nowotworowych.

Zwrócenie małych cząsteczek w kierunku oddziaływania ze zmutowanym białkiem p53 okazało się bardziej skomplikowane niż aktywacja dzikiego typu p53 w komórkach nowotworowych. Aktualnie opisano dwie małe cząsteczki, charakteryzujące się swoistym przywracaniem funkcji zmutowanego białka p53 w nowotworach hematologicznych.



Ryc. 1 – Mechanizmy indukcji apoptozy wywołane przez małe cząsteczki skierowane bezpośrednio na dziki typ lub zmutowane białko p53 oraz nowe inhibitory przekazywania sygnału przez receptor B-komórkowy (A) Nutliny hamują oddziaływanie między białkiem p53 a jego negatywnym regulatorem białkiem MDM2. Efekt ten prowadzi do skutecznej stabilizacji p53 i jego aktywacji poprzez wywołanie apoptozy oraz zahamowanie cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych. Wiążąc się z p53, RITA rozrywa jego wiązanie z MDM2 i powoduje indukcję apoptozy. W komórkach MM RITA może wiązać się z kinazą JUN (c-Jun N-terminal kinase) i również w ten sposób indukować apoptozę. (B) Cząsteczka PRIMA-1 przywraca prawidłową konformację zmutowanego białka p53 i wywołuje apoptozę komórek nowotworowych. PRIMA-1 umożliwia ponowne sfałdowanie zarówno zmutowanego, jak i dzikiego typu p53. Działanie MIRA-1 oraz jej analogów polega na przywróceniu transaktywacji genów na drodze zależnej od p53 oraz indukcji apoptozy. (C) Ibrutinib jest selektywnym inhibitorem kinazy Btk (Bruton tyrosine kinase), uczestniczącej w przekazywaniu sygnału płynącego przez BCR. Idelalisib jest selektywnym

PRIMA-1 jest związkiem chemicznym o niskim ciężarze molekularnym, który przywraca prawidłową konformację zmutowanego białka p53 i swoiście wiąże się z DNA, wywołując apoptozę komórek nowotworowych z ekspresją tej formy białka [70, 74, 96, 97]. PRIMA-1 umożliwia ponowne sfałdowanie zarówno zmutowanego, jak i dzikiego typu p53 [98]. Została ona zidentyfikowana w 2002 roku jako cząsteczka o aktywności hamującej wzrost różnych typów komórek linii nowotworowych z mutacją p53 [70, 74, 96]. W 2009 roku została ona włączona do badań klinicznych (NCT00900614), ponieważ stanowiła obiecujący lek przeciwnowotworowy [99]. Nahi i wsp. [97, 100] opisali wpływ PRIMA-1 na komórki pochodzące od chorych na CLL i AML z lub z brakiem delekcji p53. Nie wykazano żadnych istotnych różnic w odpowiedzi cytotoksycznej pomiędzy komórkami CLL z hemizygotyczną delecją p53 a komórkami bez delekcji [100]. W przypadku AML PRIMA-1 wykazywała się większą cytotoksycznością względem komórek z hemizygotyczną delecją/mutacją p53 [97]. Dodatkowo zaobserwowano jej synergistyczne lub addytywne działanie w połączeniu z fludarabiną w komórkach CLL i AML [100, 101]. Metylowany analog PRIMA-1 (*the methylated analog of PRIMA-1*; PRIMA-1Met) został również zakwalifikowany do próby klinicznej jako cząsteczka o silniejszym potencjale terapeutycznym [99]. Wykazano, że

inhibitorem izoformy  $\delta$  kinazy PI3K $\delta$  (phosphoinositide 3-kinase  $\delta$ ; PI3K $\delta$ ). Aktywna forma PI3K $\delta$  powoduje pobudzenie kinazy serynowo-treoninowej AKT oraz kinazy mTOR (mammalian target of rapamycin kinase), spełniających istotne funkcje w procesach metabolizmu komórkowego, proliferacji, migracji komórek czy przeżycia. Blokowanie kinazy PI3K $\delta$  przez idelalisib oraz kinazy Btk przez ibrutinib hamuje przekazywanie sygnału przez BCR, prowadząc do zahamowania proliferacji i indukcji apoptozy komórek białaczkowych

Fig. 1 – Induction of apoptosis caused by small molecules targeting mutant or wild type p53 and new inhibitors affected B-cell receptor signal transduction

(A) Nutlins inhibit interaction between tumor suppressor p53 and its negative regulator MDM2. This effect leads to the stabilization and activation of p53, which cause apoptosis and cell cycle arrest of malignant cells. RITA disrupts interaction between MDM2 and p53 inducing apoptosis. In MM cells, RITA can also bind to the JUN kinase (c-Jun N-terminal kinase) and triggering apoptosis. (B) Small molecule PRIMA-1 restores conformation of mutant p53 and induces apoptosis of tumor cells. PRIMA-1 can refold both unfolded mutant p53 and unfolded wild type p53. MIRA-1 acts with p53 mutant and causes restoration of p53-mediated transactivation of target genes and the induction of p53-dependent apoptosis. (C) Ibrutinib represents a selective inhibitor of the Btk kinase (Bruton tyrosine kinase), which is involved in BCR signalling transduction. Idelalisib is a selective inhibitor of the PI3K kinase  $\delta$  isoform (phosphoinositide 3-kinase  $\delta$ ). Activation of PI3K $\delta$  subsequently activates the kinases AKT and mTOR (mammalian target of rapamycin kinase), and exerts multiple effects on metabolism, proliferation, cell migration, and survival. Both ibrutinib and idelalisib block BCR signaling, which inhibits proliferation and drives cells into apoptosis

PRIMA-1Met może w sposób selektywny oddziaływać na zmutowane białko p53 i indukować apoptozę w komórkach nowotworowych, jednocześnie nie wywołując znacznego wpływu na dziki typ p53 w komórkach prawidłowych [96]. Do tej pory oddziaływanie PRIMA-1Met na p53 w komórkach nowotworowych bez mutacji p53 nie jest w pełni poznane. Wydaje się, że PRIMA-1Met może odgrywać rolę cząsteczki przywracającej funkcje nieaktywnemu białku p53, niezależnie od stanu mutacji. Wyniki ostatnich badań dowodzą, że PRIMA-1Met może wywoływać apoptozę również w komórkach z dzikim typem p53 lub w komórkach bez ekspresji p53 [100–102]. Badania na komórkach MM charakteryzujących się ekspresją lub brakiem ekspresji p53 sugerują, że apoptoza może być wywołana na drodze aktywacji białka p73 [102].

Kolejną cząsteczką indukującą apoptozę w komórkach z mutacją p53 jest MIRA-1. Wykazuje ona odmienną od PRIMA-1 strukturę i wydaje się mieć silniejsze działanie [103]. Reaktywacja zmutowanego białka p53 poprzez cząsteczkę MIRA-1 zachodzi poprzez indukowanie ekspresji genów zależnych od p53, takich jak p21, MDM2 oraz Puma, w guzach litych. Uważa się, że działanie MIRA-1 oraz jej analogów polega na przywróceniu transaktywacji genów na drodze zależnej od p53 oraz indukcji apoptozy. Na podstawie badań przeprowadzonych na liniach komórkowych oraz komórkach pochodzących od chorych na MM stwierdzono, że aktywność MIRA-1 jest niezależna od stanu mutacji p53 [104]. Rycina 1B przedstawia uogólniony schemat działania cząsteczek PRIMA-1 i MIRA-1 na zmutowaną postać białka p53 inicjujących apoptozę komórek białaczkowych.

### Nowe metody leczenia skuteczne u chorych z nieprawidłowościami szlaku p53

Do niedawna chorzy na CLL z mutacją TP53 bądź delecją 17p byli leczeni konwencjonalnym schematem CIT (na przykład FCR) lub terapią opartą na alemtuzumabie (samym bądź skojarzonym z kortykosteroidami) [105, 106]. Czas trwania remisji osiągnęli u tych pacjentów był jednak znacznie krótszy w porównaniu z innymi grupami ryzyka, dlatego allogeniczne przeszczepiane krwiotwórczych komórek macierzystych (*allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*; allo-HSCT) wydawało się jedyną opcją terapeutyczną. Wyniki aktualnych badań określiły skuteczność tej metody na ok. 40% remisji utrzymujących się w fazie plateau, co może sugerować, że ta forma leczenia może prowadzić do wyleczenia pewnej liczby chorych na CLL. Opcja ta powinna być jednak uważnie przedyskutowana oraz jest zarezerwowana dla chorych opornych/nawrotowych mających nieprawidłowości TP53.

Sytuacja terapeutyczna w CLL uległa istotnym zmianom w ostatnich latach wraz z wprowadzeniem dwóch inhibitorów przekazywania sygnału przez BCR. Według najnowszych zaleceń Europejskiego Towarzystwa Onkologii Medycznej (*European Society for Medical Oncology*; EMSO) pierwszą linią leczenia dla chorych na CLL z delecją bądź mutacją genu TP53 są nowe inhibitory: ibrutynib oraz idelalizyb w połączeniu z rytuksymabem [107]. U chorych odpowiadających na leczenie tymi inhibitorami alloHSCT jest kwestią dyskusyjną i zależy od indywidualnych oraz związanych z przeszczepianiem czynników ryzyka [108]. Kontynuowanie leczenia u chorych

z podwyższonym ryzykiem nawrotu może przynosić pewne korzyści, jednak nie jest w pełni rekomendowane [107].

Ibrutynib jest selektywnym inhibitorem kinazy Brutona (*Bruton tyrosine kinase*; Btk), uczestniczącej w przekazywaniu sygnału płynącego przez BCR. Ibrutynib wiąże się do reszty cysteiny w miejscu aktywnym Btk, powodując jego trwałe unieczynnienie, przez co uniemożliwia przekazywanie sygnału [109]. Badania przeprowadzone na chorych z rozrostami B-komórkowymi, w tym CLL oraz chłoniakiem z małych limfocytów B (*small lymphocytic leukemia*; SLL) wykazały, że ibrutynib jest lekiem o dobrej tolerancji, związanym z wysokim wskaźnikiem odpowiedzi [110–112]. W grupie 85 chorych na nawrotową lub oporną postać CLL/SLL w fazie 1b/2 badania klinicznego (NCT01105247) wykazano, że całkowity odsetek odpowiedzi (*overall response rate*; ORR) został osiągnięty u 71% chorych, przy czym 26-miesięczny czas wolny od progresji (*progression free survival*, PFS) osiągnęło 75% chorych [111]. Wyniki 3. fazy badania klinicznego (NCT01578707) nad skutecznością leczenia ibrutynibem w porównaniu z ofatumumabem wykazały, że chorzy na CLL/SLL, którzy leczeni byli wcześniej przynajmniej jednym schematem, osiągnęli istotnie dłuższe całkowite przeżycie (*overall survival*; OS), PFS oraz ORR [113]. Nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic w 12-miesięcznym PFS między chorymi charakteryzującymi się brakiem lub występowaniem delecji 17p [113]. Wstępne wyniki 2. fazy badania klinicznego (NCT01744691) prowadzonego na 144 chorych na nawrotową lub oporną postać CLL/SLL z delecją 17p wykazały znaczną skuteczność leczenia ibrutynibem w odniesieniu do ORR, PFS oraz czasu trwania odpowiedzi (*duration of response*; DOR) [114]. W 12. miesiącu badania 79,3% pacjentów pozostawało wolnych od progresji, co było zgodne z wcześniejszymi wynikami [114].

Idelalizyb jest selektywnym inhibitorem izoformy  $\delta$  kinazy PI3K (*phosphoinositide 3-kinase  $\delta$* ; PI3K $\delta$ ), ulegającej ekspresji w leukocytach i odgrywającej kluczową rolę w przekazywaniu sygnału przez receptor BCR [115]. Aktywna forma PI3K $\delta$  powoduje pobudzenie kinazy serynowo-treoninowej AKT oraz kinazy mTOR (*mammalian target of rapamycin kinase*), spełniających istotne funkcje w procesach metabolizmu komórkowego, proliferacji, migracji komórek czy przeżycia [116]. Blokowanie kinazy PI3K $\delta$  przez idelalizyb hamuje przekazywanie sygnału na ścieżce PI3K $\delta$ /AKT, co prowadzi do apoptozy komórek białaczkowych. Wyniki badań 3 fazy próby klinicznej (NCT01539) nad skutecznością leczenia idelalizybu w połączeniu z rytuksymabem w porównaniu z placebo z rytuksymabem wykazały istotne wydłużenie PFS, ORR oraz OS wśród chorych na nawrotową postać CLL leczonych pierwszym schematem leków [117]. Według najnowszych danych, mediana PFS w grupie leczonych idelalizybem osiągnęła 19,4 miesiąca, podczas gdy w grupie placebo wynosiła 6,5 miesiąca. Efekt leczenia idelalizybem był podobny we wszystkich grupach chorych, niezależnie od stanu mutacji TP53, delecji 17p czy mutacji IGHV [117]. O'Brien i wsp. [118] opisali wyniki 2. fazy próby klinicznej (NCT01203930) nad skutecznością leczenia idelalizybem i rytuksymabem u nieleczonych wcześniej chorych na CLL/SLL. ORR został osiągnięty u 97% chorych, z których 19% osiągnęło całkowitą odpowiedź. U pacjentów z delecją 17p lub mutacją TP53 ORR wynosił 100%, natomiast u chorych z niezmutowanym genem IGHV ORR wynosił 97%. W 36. miesiącu badania PFS osiągnęło 83%

chorych [118]. Schemat działania ibrutynibu oraz idelalazybu na przekaznictwo BCR został przedstawiony na rycinie 1C.

Aktualne wytyczne ESMO nie rekomendują terapii alemtuzumabem w pierwszej linii nawet u starszych chorych z delecją 17p, pomimo że ten lek wykazywał istotnie wyższe odsetki odpowiedzi w porównaniu z chlorambucilem w tej grupie chorych [119]. Pomimo braku bezpośredniego porównania alemtuzumabu z terapią inhibitorami przekaznictwa przez BCR, zarówno ibrutynib, jak i idelalazyb w połączeniu z rytuksymabem wykazują znacznie większą aktywność w badaniach rejestracyjnych w grupach chorych opornych/nawrotowych, u których można się było spodziewać gorszych odpowiedzi.

Spośród innych cząsteczek mogących mieć znaczenie w leczeniu rozrostów hematologicznych można zwrócić uwagę na bromowoderek halofuginonu (*halofuginone hydrobromide*; HF) czy cząsteczkę JNJ-26854165, będącą pochodną tryptaminy. W swoich badaniach *in vitro* oraz *in vivo* Leiba i wsp. [120] opisali HR jako cząsteczkę wywołującą zahamowanie wzrostu zarówno komórek linii szpiczakowych, jak i komórek od chorych na MM. Dodatkowo HR nasilał cytotoxycytność innych leków, jak melfalan, deksametazon, dokso-rubicyna czy lenalidomid [120]. JNJ-26854165 została opisana jako cząsteczka blokująca proteosomalną degradację p53 oraz indukująca apoptozę w komórkach linii białaczkowych z prawidłowym bądź zmutowanym p53 [121]. Kolejną grupę stanowią inhibitory białka Bcl2, będącego istotnym regulatorem apoptozy i wykazującego zwiększoną ekspresję w komórkach CLL [122]. Do związków z tej grupy należą: obatoklaks (GX15-070), nawitoklaks (Abt-263) czy nawitoklaks (Abt-199) [123–125]. Szczególnie wyniki badań klinicznych z zastosowaniem tego ostatniego wydają się bardzo obiecujące w grupie chorych na CLL z aberracjami TP53. Prowadzane są badania nad skutecznością leczenia inhibitorami kinaz cyklinozależnych (*cyclin-dependent kinases*; CDK), mogącymi przynosić pewne korzyści w leczeniu chorych z delecją 17p [126].

Podsumowując, zaburzenia szlaku TP53 obejmujące zarówno delecję 17p, jak i mutacje TP53, stanowią istotny problem w leczeniu chorych na nowotwory hematologiczne. Wyniki prac badawczych mających na celu aktywację szlaku p53, czyli odwrócenie biologicznego efektu mutacji, są bardzo obiecujące, jednak przełomowe wydaje się wprowadzenie do terapii leków o innych mechanizmach działania skuteczne u chorych z mutacją genu TP53.

### Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

### Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

### Finansowanie/Financial support

Artykuł powstał dzięki wsparciu firmy Gilead Sciences Poland, jednakże w pracy nie zachodzi konflikt interesów,

a prezentowana w niej problematyka ma charakter obiektywny.

### Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

### PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 1986;6:1379–1385. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.6.5.1379.Updated>.
- [2] Yang a, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. P63, a P53 Homolog At 3Q27-29, Encodes Multiple Products With Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Mol Cell* 1998;2:305–316. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80275-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80275-0).
- [3] Khoury MP, Bourdon J-C. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer* 2011;2:453–465. <http://dx.doi.org/10.1177/1947601911408893>.
- [4] Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2014;14:359–370. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3711>.
- [5] Levine AJ. P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 1997;88:323–331. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81871-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81871-1).
- [6] Levine AJ, Momand J, Finlay Ca. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453–456. <http://dx.doi.org/10.1038/351453a0>.
- [7] Finlay Ca, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989;57:1083–1093. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90045-7](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(89)90045-7).
- [8] El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:1169–1174.
- [9] Sigal A, Rotter V. Oncogenic Mutations of the p53 Tumor Suppressor: The Demons of the Guardian of the Genome. *Cancer Res* 2000;53:6788–6793. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.3819>.
- [10] Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1442–1455.
- [11] Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *JCO* 1998;16:3158–3168.
- [12] Oren M, Rotter V. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a001107>. a001107–a001107.
- [13] Soussi T, Dehouche K. p53 Website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: Forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* 2000;15:105–113. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<105::AID-HUMU19>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<105::AID-HUMU19>3.0.CO;2-G).
- [14] Nahi H, Selivanova G, Lehmann S, Möllgård L, Bengtzen S, Concha H, et al. Mutated and non-mutated TP53 as targets in the treatment of leukaemia. *Br J Haematol* 2008;141:445–453. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07046.x>.
- [15] Agirre X, Novo FJ, Calasanz MJ, Larráyoiz MJ, Lahortiga I, Valgañón M, et al. TP53 Is Frequently Altered by



- Methylation, Mutation, and/or Deletion in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Mol Carcinog* 2003;38:201-208. <http://dx.doi.org/10.1002/mc.10159>.
- [16] Pekova S, Mazal O, Cmejla R, Hardekopf DW, Plachy R, Zejskova L, et al. A comprehensive study of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of 1287 diagnostic and 1148 follow-up CLL samples. *Leuk Res* 2011;35:889-898. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2010.12.016>.
- [17] Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK* 2008;22:1539-1541. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.143>.
- [18] Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood* 2012;119:2114-2121. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-08-375758>.
- [19] Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, Lai JL, Pignon JM, Loucheux-Lefebvre MH, et al. P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 1991;78:1652-1657.
- [20] Slingerland JM, Minden MD, Benchimol S. Mutation of the p53 gene in human acute myelogenous leukemia. *Blood* 1991;77:1500-1507.
- [21] Hou H, Chou W-C, Kuo Y-Y, Liu C-Y, Lin L-I, Tseng M-H, et al. TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution. *Blood Cancer J* 2015;5:e331. <http://dx.doi.org/10.1038/bcj.2015.59>.
- [22] Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. The p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Lung Cancer* 1994;11:126-127. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-5002\(94\)92083-4](http://dx.doi.org/10.1016/0169-5002(94)92083-4).
- [23] Prokocimer M, Unger R, Rennert HS, Rotter V, Rennert G. Pooled analysis of p53 mutations in hematological malignancies. *Hum Mutat* 1998;12:4-18. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:1<4::AID-HUMU2>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:1<4::AID-HUMU2>3.0.CO;2-G).
- [24] Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;43:227-238. <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.20193>.
- [25] Seifert H, Mohr B, Thiede C, Oelschlägel U, Schäkel U, Illmer T, et al. The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK* 2009;23:656-663. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.375>.
- [26] Zhu YM, Das-Gupta EP, Russell NH. Microsatellite instability and p53 mutations are associated with abnormal expression of the MSH2 gene in adult acute leukemia. *Blood* 1999;94:733-740.
- [27] Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, et al. P53 Mutations Are Associated With Resistance To Chemotherapy and Short Survival in Hematologic Malignancies. *Blood* 1994;84:3148-3157.
- [28] Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, Christiansen DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2008;22:240-248. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2405078>.
- [29] Christiansen D, Andersen M, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001;19:1405-1413.
- [30] Merlat A, Lai J, Sterkers Y, Demory J, Bauters F, Preudhomme C, et al. Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 17p deletion. A report on 25 cases. *Leukemia* 1999;13:250-257.
- [31] Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 2011;364:2496-2506. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1013343>.
- [32] Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, Mohamedali AM, Krishnamurthy P, Lea NC, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol* 2013;160:660-672. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12203>.
- [33] Horiike S, Kita-Sasai Y, Nakao M, Taniwaki M. Configuration of the TP53 gene as an independent prognostic parameter of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2003;44:915-922. <http://dx.doi.org/10.1080/1042819031000067620>.
- [34] Wada M, Bartram CR, Nakamura H, Hachiya M, Chen DL, Borenstein J, et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993;82:3163-3169.
- [35] Hof J, Krentz S, Van Schewick C, Körner G, Shalapur S, Rhein P, et al. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:3185-3193. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2011.34.8144>.
- [36] Zhu YM, Feroni L, McQuaker IG, Papaioannou M, Haynes A, Russell HH. Mechanisms of relapse in acute leukaemia: involvement of p53 mutated subclones in disease progression in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 1999;79:1151-1157. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6690183>.
- [37] Tang JL, Tien HF, Lin MT, Chen PJ, Chen YC. Frequent p53 mutation in relapsed acute lymphoblastic leukemia with cytogenetic instability: A longitudinal analysis. *Anticancer Res* 1998;18:1273-1278.
- [38] Chiaretti S, Brugnoletti F, Tavaloro S, Bonina S, Paoloni F, Marinelli M, et al. TP53 mutations are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia cases negative for recurrent fusion genes and correlate with poor response to induction therapy. *Haematologica* 2013;98:59-61. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2012.076786>.
- [39] Fenaux P, Preudhomme C, Quiquandon I, Jonveaux P, Lai JL, Vanrumbeke M, et al. Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1992;80:178-183.
- [40] Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Habe S, Winkler D, et al. TP53 Mutation and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 2010;28:4473-4479. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.27.8762>.
- [41] Stengel A, Schnittger S, Weissmann S, Kuznia S, Kern W, Kohlmann A, et al. TP53 mutations occur in 15.7% of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis. *Blood* 2014;124:251-258. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-02-558833>.
- [42] Chng WJ, Price-Troska T, Gonzalez-Paz N, Van Wier S, Jacobus S, Blood E, et al. Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia* 2007;21:582-584. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404524>.
- [43] Lode L, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Wuilleme S, Richebourg S, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica* 2010;95:1973-1976. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2010.023697>.
- [44] Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic

- leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010;10:37-50. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2764>.
- [45] Zenz T, Häbe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Bühler A, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009;114:2589-2597. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-05-224071>.
- [46] Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: Implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009;15:995-1004. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1630>.
- [47] Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: Results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011;29:2223-2229. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.32.0838>.
- [48] Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009;23:117-124. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.274>.
- [49] Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010;24:2072-2079. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2010.208>.
- [50] Malcikova J, Pavlova S, Kozubik KS, Pospisilova S. TP53 mutation analysis in clinical practice: Lessons from chronic lymphocytic leukemia. *Hum Mutat* 2014;35:663-671. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22508>.
- [51] Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian S, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007;28:622-629. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20495>.
- [52] Hamblin BTJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V. Analysis 1999;94:1848-1854.
- [53] Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto a, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.
- [54] Cesano A, Perbellini O, Evensen E, Chu CC, Cioffi F, Ptacek J, et al. Association between B-cell receptor responsiveness and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: Results from single cell network profiling studies. *Haematologica* 2013;98:626-634. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2012.071910>.
- [55] Malcikova J, Stalika E, Davis Z, Plevova K, Trbusek M, Mansouri L, et al. The frequency of TP53 gene defects differs between chronic lymphocytic leukaemia subgroups harbouring distinct antigen receptors. *Br J Haematol* 2014;166:621-625. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12893>.
- [56] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200012283432602>.
- [57] Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121:1403-1412. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-09-458265>.
- [58] Zenz T, Gribben JG, Hallek M, Dohner H, Keating MJ, Stilgenbauer S. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood* 2012;119:4101-4107. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-11-312421>.
- [59] Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater aP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26:1458-1461. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.25>.
- [60] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446-5456. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-06-093906>.
- [61] Oscier D, Dearden C, Erem E, Fegan C, Follows G, Hillmen P, et al. Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012;159. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12067>. n/a - n/a.
- [62] Silva AL, Romão L. The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: To decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Lett* 2009;583:499-505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.058>.
- [63] Kringen P, Bergamaschi A, Due EU, Wang Y, Tagliabue E, Nesland JM, et al. Evaluation of arrayed primer extension for TP53 mutation detection in breast and ovarian carcinomas. *Biotechniques* 2005;39:755-761. <http://dx.doi.org/10.2144/000112000>.
- [64] Tönisson N, Zernant J, Kurg A, Pavel H, Slavin G, Roomere H, et al. Evaluating the arrayed primer extension resequencing assay of TP53 tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5503-5508. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.082100599>.
- [65] Meacham F, Boffelli D, Dhahbi J, Martin DI, Singer M, Pachter L. Identification and correction of systematic error in high-throughput sequence data. *BMC Bioinformatics* 2011;12:451. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-12-451>.
- [66] Flaherty P, Natsoulis G, Muralidharan O, Winters M, Buenrostro J, Bell J, et al. Ultrasensitive detection of rare mutations using next-generation targeted resequencing. *Nucleic Acids Res* 2012;40:1-12. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr861>.
- [67] Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014;123:2139-2147. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-11-539726>.
- [68] Stegh AH. Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:67-83. <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2011.643299>.
- [69] Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;49:223-241. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094723>.
- [70] Selivanova G. Therapeutic targeting of p53 by small molecules. *Semin Cancer Biol* 2010;20:46-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.02.006>.
- [71] Lane DP, Brown CJ, Verma C, Cheek CF. New insights into p53 based therapy. *Discov Med* 2011;12:107-117.
- [72] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303:844-848. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1092472>.
- [73] Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LGGC, Masucci M, et al. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in

- tumors. *Nat Med* 2004;10:1321-1328. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1146>.
- [74] Wiman KG. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 2010;29:4245-4252. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.188>.
- [75] Seemann S, Maurici D, Olivier M, Caron de Fromentel C, Hainaut P. The tumor suppressor gene TP53: implications for cancer management and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004;41:551-583. <http://dx.doi.org/10.1080/10408360490504952>.
- [76] Saha MN, Micallef J, Qiu L, Chang H. Pharmacological activation of the p53 pathway in haematological malignancies. *J Clin Pathol* 2010;63:204-209. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2009.070961>.
- [77] Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1888-1893. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507493103>.
- [78] Gu L, Zhu N, Findley HW, Zhou M. MDM2 antagonist nutlin-3 is a potent inducer of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells with wild-type p53 and overexpression of MDM2. *Leukemia* 2008;22:730-739. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.11>.
- [79] Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, et al. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood* 2005;106:3150-3159. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-02-0553>.
- [80] Long J, Parkin B, Ouillet P, Bixby D, Shedden K, Erba H, et al. Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* 2010;116:71-80. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-261628>.
- [81] Saha MN, Jiang H, Chang H. Molecular mechanisms of nutlin-induced apoptosis in multiple myeloma: evidence for p53-transcription-dependent and -independent pathways. *Cancer Biol Ther* 2010;10:567-578.
- [82] Bo MD, Secchiero P, Degan M, Marconi D, Bomben R, Pozzato G, et al. MDM4 (MDMX) is overexpressed in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and marks a subset of p53 wild-type CLL with a poor cytotoxic response to Nutlin-3. *Br J Haematol* 2010;150:237-239. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08185.x>.
- [83] Thompson T, Andreeff M, Studzinski GP, Vassilev LT. 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the apoptotic activity of MDM2 antagonist nutlin-3a in acute myeloid leukemia cells expressing wild-type p53. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1158-1168. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1036>.
- [84] Vilas-Zornoza A, Agirre X, Martín-Palanco V, Martín-Subero JJ, San José-Eneriz E, Garate L, et al. Frequent and simultaneous epigenetic inactivation of TP53 pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 2011;6:e17012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017012>.
- [85] Peterson LF, Mitrikeska E, Giannola D, Lui Y, Sun H, Bixby D, et al. p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells. *Leukemia* 2011;25:761-769. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2011.7>.
- [86] Kurosu T, Wu N, Oshikawa G, Kagechika H, Miura O. Enhancement of imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells by nutlin-3 through synergistic activation of the mitochondrial apoptotic pathway. *Apoptosis* 2010;15:608-620. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-010-0457-0>.
- [87] Lu K, Wang X. Therapeutic advancement of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol* 2012;5:55. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-8722-5-55>.
- [88] Secchiero P, di Iasio MG, Melloni E, Voltan R, Celeghini C, Tiribelli M, et al. The expression levels of the pro-apoptotic XAF-1 gene modulate the cytotoxic response to Nutlin-3 in B chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010;24:480-483. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.215>.
- [89] Zauli G, di Iasio MG, Secchiero P, Dal Bo M, Marconi D, Bomben R, et al. Exposure of B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells to nutlin-3 induces a characteristic gene expression profile, which correlates with nutlin-3-mediated cytotoxicity. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9:510-518.
- [90] Zauli G, Voltan R, Bosco R, Melloni E, Marmiroli S, Rigolin GM, et al. Dasatinib plus Nutlin-3 shows synergistic antileukemic activity in both p53 wild-type and p53 mutated B chronic lymphocytic leukemias by inhibiting the Akt pathway. *Clin Cancer Res* 2011;17:762-770. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2572>.
- [91] Stühmer T, Chatterjee M, Hildebrandt M, Herrmann P, Gollasch H, Gerecke C, et al. Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood* 2005;106:3609-3617. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-04-1489>.
- [92] Ooi MG, Hayden PJ, Kotoula V, McMillin DW, Charalambous E, Daskalaki E, et al. Interactions of the Hdm2/p53 and proteasome pathways may enhance the antitumor activity of bortezomib. *Clin Cancer Res* 2009;15:7153-7160. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1071>.
- [93] Saha MN, Jiang H, Mukai A, Chang H. RITA inhibits multiple myeloma cell growth through induction of p53-mediated caspase-dependent apoptosis and synergistically enhances nutlin-induced cytotoxic responses. *Mol Cancer Ther* 2010;9:3041-3051. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0471>.
- [94] Krajewski M, Ozdowry P, D'Silva L, Rothweiler U, Holak TA. NMR indicates that the small molecule RITA does not block p53-MDM2 binding in vitro. *Nat Med* 2005;11:1135-1136. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1105-1135>. author reply 1136-7.
- [95] Saha MN, Jiang H, Yang Y, Zhu X, Wang X, Schimmer AD, et al. Targeting p53 via JNK pathway: a novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma. *PLoS One* 2012;7:e30215. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030215>.
- [96] Bykov VJN, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 2002;8:282-288. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0302-282>.
- [97] Nahi H, Merup M, Lehmann S, Bengtzen S, Möllgård L, Selivanova G, et al. PRIMA-1 induces apoptosis in acute myeloid leukaemia cells with p53 gene deletion. *Br J Haematol* 2006;132:230-236. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05851.x>.
- [98] Lambert JMR, Gorzov P, Veprintsev DB, Söderqvist M, Segerbäck D, Bergman J, et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 2009;15:376-388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.003>.
- [99] Lehmann S, Bykov VJN, Ali D, Andrén O, Cherif H, Tidéfelt U, et al. Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:3633-3639. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2011.40.7783>.
- [100] Nahi H, Lehmann S, Mollgard L, Bengtzen S, Selivanova G, Wiman KG, et al. Effects of PRIMA-1 on chronic lymphocytic leukaemia cells with and without hemizygous p53 deletion. *Br J Haematol* 2004;127:285-291. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05210.x>.
- [101] Ali D, Jönsson-Videsäter K, Deneberg S, Bengtzen S, Nahi H, Paul C, et al. APR-246 exhibits anti-leukemic activity and synergism with conventional chemotherapeutic drugs in acute myeloid leukemia cells. *Eur J Haematol* 2011;86:206-215. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.2010.01557.x>.

- [102] Saha MN, Jiang H, Mei-Hsi C, Chang H. p53-independent anti-myeloma activity of Prima-1met. *ASH Annu Meet Abstr Blood Blood* 2011;118:1826.
- [103] Bykov VJN, Issaeva N, Zache N, Shilov A, Hultcrantz M, Bergman J, et al. Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *J Biol Chem* 2005;280:30384-30391. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M501664200>.
- [104] Saha MN, Jiang H, Chang H. A novel small molecule MIRA-1 induces cytotoxicity in multiple myeloma cells harbouring wild type or mutant p53. *Mod Pathol* 2012;25:1534.
- [105] Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London England)* 2010;376:1164-1174. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61381-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61381-5).
- [106] Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J, et al. Alemtuzumab Compared With Chlorambucil As First-Line Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 2007;25:5616-5623. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2007.12.9098>.
- [107] Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26:v78-v84. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv303>.
- [108] Dreger P, Schetelig J, Andersen N, Corradini P, Gelder M Van, Gribben J, et al. Perspectives Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood* 2015;124:3841-3849. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-07-586826>. [partners](http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-07-586826.partners).
- [109] Pan Z, Scheerens H, Li S-J, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, et al. Discovery of Selective Irreversible Inhibitors for Bruton's Tyrosine Kinase. *ChemMedChem* 2007;2:58-61. <http://dx.doi.org/10.1002/cmde.200600221>.
- [110] Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Has Significant Activity in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies. *J Clin Oncol* 2013;31:88-94. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2012.42.7906>.
- [111] Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2013;369:32-42. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1215637>.
- [112] O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, Sharman JP, Burger JA, Blum KA, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:48-58. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70513-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70513-8).
- [113] Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus Ofatumumab in Previously Treated Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med* 2014;371:213-223. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1400376>.
- [114] O'Brien S, Jones JA, Coutre S, Mato AR, Hillmen P. Efficacy and Safety of Ibrutinib in Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia or Small Lymphocytic Leukemia with 17p Deletion: Results from the Phase II RESONATETM-17 Trial. *ASH Annu Meet Abstr Blood Blood* 2014;124:327.
- [115] Lannutti BJ, Meadows Sa, Herman SEM, Kashishian A, Steiner B, Johnson AJ, et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011;117:591-594. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-03-275305>.
- [116] Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006;7:606-619. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1879>.
- [117] Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014;370:997-1007. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1315226>.
- [118] O'Brien SM, Lamanna N, Kipps TJ, Flinn I, Zelenetz AD, Burger JA, et al. A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naive older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2015. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-03-630947>.
- [119] Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J, et al. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007;25:5616-5623. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-03-630947>.
- [120] Leiba M, Jakubikova J, Klippel S, Mitsiades CS, Hideshima T, Tai Y-T, et al. Halofuginone inhibits multiple myeloma growth in vitro and in vivo and enhances cytotoxicity of conventional and novel agents. *Br J Haematol* 2012;157:718-731. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09120.x>.
- [121] Kojima K, Burks JK, Arts J, Andreeff M. The novel tryptamine derivative NJN-26854165 induces wild-type p53- and E2F1-mediated apoptosis in acute myeloid and lymphoid leukemias. *Mol Cancer Ther* 2010;9:2545-2557. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0337>.
- [122] Buggins AGS, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2010;34:837-842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2010.03.011>.
- [123] O'Brien SM, Claxton DF, Crump M, Faderl S, Kipps T, Keating MJ, et al. Phase I study of obatocic mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:299-305. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-02-137943>.
- [124] Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: Results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol* 2012;30:488-496. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2011.34.7898>.
- [125] Anderson MA, Tam CC, Seymour JF, Bell A, Westerman DA, Juneja S, et al. Selective Bcl-2 Inhibition With ABT-199 Is Highly Active Against Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Irrespective of TP53 Mutation Or Dysfunction. *ASH Annu Meet Abstr Blood Blood* 2013;122:1304.
- [126] Woyach JA, Lozanski G, Ruppert AS, Lozanski A, Blum KA, Jones JA, et al. Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features. *Leukemia* 2012;26:1442-1444. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2011.375>.